



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0023888

(51)⁷ C12N 7/02; A61K 39/13

(13) B

(21) 1-2012-00401

(22) 08/07/2010

(86) PCT/EP2010/059796 08/07/2010

(87) WO2011/006823 20/01/2011

(30) 61/271,038 16/07/2009 US; 09165620.7 16/07/2009 EP

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/04/2012 289A

(73) Janssen Vaccines & Prevention B.V. (NL)

Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden, The Netherlands

(72) LEWIS, John, Alfred (US)

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT VIRUT GÂY BỆNH BẠI LIỆT VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT VACXIN BẠI LIỆT

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất virus gây bệnh bại liệt, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tạo ra huyền phù nuôi cấy của các tế bào không chứa huyết thanh, trong đó các tế bào là tế bào PER.C6, b) gây nhiễm tế bào này với virus gây bệnh bại liệt, với mật độ tế bào từ 2×10^6 tế bào/ml đến 150×10^6 tế bào/ml, và c) thu hoạch virus gây bệnh bại liệt ở thời gian từ 12 đến 48 giờ sau khi gây nhiễm. Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất vaccine bại liệt.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực nuôi cấy tế bào và sản xuất virus gây bệnh bại liệt. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến các quy trình cải tiến để nuôi cấy tế bào và sản xuất virus gây bệnh bại liệt để từ đó sản xuất vaccine bại liệt.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các virus gây bệnh bại liệt là thành viên của loại virus Enterovirus thuộc họ Picornaviridae. Các virus gây bệnh bại liệt là các virus nhỏ, không có màng bao bằng vỏ protein bao hệ gen ARN chuỗi đơn dương. Có ba kiểu virus gây bệnh bại liệt: kiểu 1, 2 và 3. Sự nhiễm virus gây bệnh bại liệt của các cá nhân nhạy cảm có thể dẫn đến bệnh bại liệt bị liệt. Bệnh bại liệt là bệnh lây cao. Hai vaccine bại liệt khác nhau đã được phát hiện, vaccine bại liệt bất hoạt (inactivated poliovirus vaccine - IPV) của Salk, và vaccine bại liệt sống dùng qua miệng đã được giảm độc lực (oral poliovirus vaccine - OPV) của Sabin. Cả hai vaccine đều an toàn và hiệu quả. Mỗi vaccine đều có ưu điểm và nhược điểm, và cả hai vaccine đều đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát bệnh bại liệt. Để xem về các virus gây bệnh bại liệt và vaccine bại liệt ví dụ xem tài liệu Kew et al, 2005.

Vaccine bại liệt dùng qua miệng (Oral polio vaccine - OPV) rẻ và tiện lợi, và đã được sử dụng hàng loạt. Tuy nhiên, đôi khi người dùng vaccine mắc bệnh bại liệt bị liệt có liên quan đến vaccine (vaccine-associated paralytic poliomyelitis - VAPP) do virus hồi phục trong vaccine. Hơn nữa, đã quan sát thấy trong cộng đồng mà chưa có miễn dịch hoàn toàn thì các chủng virus gây bệnh bại liệt của Sabin đã được giảm độc lực có các thay đổi đột biến đủ để gây bùng phát bệnh bại liệt mà không thể phân biệt được trên lâm sàng và dịch tễ học so với bệnh bại liệt kiểu nguyên thủy xảy ra tự nhiên; do đó các đột biến này được gọi là các virus gây bệnh bại liệt có nguồn gốc từ vaccine lưu thông hoặc các cVDPV (ví dụ xem tài liệu Kew et al, 2005; Wright và Modlin, 2008; Yakovenko et al, 2009).

Có một sự nhất trí tăng lên là vaccin bại liệt bất hoạt (inactivated poliovirus vaccine - IPV) có thể góp phần trừ diệt rất nhanh bệnh bại liệt kiểu nguyên thủy và kiểm soát cVDPV xảy ra khi được sử dụng cùng với các chiến lược OPV hiện nay (Wright và Modlin, 2008; John, 2009).

Tuy nhiên, việc sản xuất IPV rất tốn kém (ví dụ xem tài liệu John, 2009) và thậm chí có thể là đất tiền bị ngăn cản đối với các nước kém phát triển và kém phát triển nhất, mà ở đó vẫn tồn tại một nhu cầu mạnh mẽ về vaccin bại liệt. Các hệ thống nuôi cấy để sản xuất nguyên liệu virus gây bệnh bại liệt khối lượng lớn mà có thể được sử dụng trong vaccin, cụ thể là virus gây bệnh bại liệt không được giảm độc lực, góp phần lớn vào việc dẫn đến chi phí tương đối cao.

Do đó, trong lĩnh vực vẫn tồn tại nhu cầu về các hệ nuôi cấy hiệu quả để sản xuất virus gây bệnh bại liệt để sử dụng trong vaccin.

Việc nhân lên virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào HEK293 đã được mô tả như là hệ thống để nghiên cứu các phenotyp sao chép đặc hiệu neuron của virus gây bệnh bại liệt, và nó đã mô tả rằng các dạng virus gây bệnh bại liệt đã được giảm độc lực, như là virus gây bệnh bại liệt chứa các đột biến điểm trong yếu tố IRES như có trong các chủng Sabin, đã biểu thị việc nhân lên bị giảm đi trong các tế bào HEK293 (Campbell et al, 2005).

Các tế bào võng mạc phôi thai người bắt từ E1 (human embryonic retina - HER), cụ thể là các tế bào PER.C6, được mô tả là thích hợp để nhân lên nhiều loại virus khác nhau, nhấn mạnh vào virus cúm (Pau et al, 2001; WO 01/38362). Mặc dù, WO 01/38362 mô tả các ví dụ về việc nhân lên của nhiều chủng virus cúm khác nhau, và của virus Herpes Simplex (HSV) typ 1 và 2, virus sởi và rotavirus trên các tế bào PER.C6, thì việc nhân lên của virus gây bệnh bại liệt không được minh họa bằng ví dụ trong WO 01/38362. Hơn nữa, các điều kiện để sao chép virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào này chưa được mô tả, và không thể dễ dàng dự đoán dựa trên sự sao chép của các virus không liên quan trên các tế bào này. Do đó, cho đến nay vẫn chưa biết được liệu có thể sản xuất được virus gây bệnh bại liệt ở quy mô công nghiệp cho mục đích sản xuất vaccin trên các tế bào này.

Để sản xuất vaccin bại liệt bị bất hoạt ở quy mô lớn, thì virus gây bệnh bại liệt nhìn chung được nhân lên trên các tế bào Vero, mà có nguồn gốc từ khỉ. Các tế bào Vero được sử dụng rộng rãi để sản xuất vaccin, bao gồm vaccin bại liệt bị bất hoạt cũng như được giảm độc lực tính sống, và do đó tiến xa là các dòng tế bào liên tục được chấp nhận rộng rãi nhất bởi các cơ quan điều tiết để sản xuất các vaccin virus, và sử dụng các tế bào này để sản xuất vaccin là được trông đợi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (Barrett et al, 2009).

Việc nuôi cấy các tế bào Vero trên vi chất mang ở quy mô lớn cho vaccin bại liệt bị bất hoạt đã được mô tả bởi Montagnon et al, 1982 và 1984. Quy trình sản xuất vaccin bại liệt ở quy mô lớn bằng cách sử dụng các tế bào Vero, và vaccin thu được, cũng được mô tả trong patent Mỹ số 4,525,349.

Các hàm lượng cao của việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt (Sabin typ 1) (gần 2×10^9 TCID₅₀/ml) đã được mô tả bởi (Merten et al, 1997) với các điều kiện khi các tế bào Vero trên các vi chất mang được nuôi cấy trong môi trường chứa huyết thanh trước pha sản xuất virus trong môi trường không chứa huyết thanh, nhưng xét về nhược điểm của việc sử dụng huyết thanh thì các tác giả này đã chỉ ra rằng một quy trình hoàn toàn không chứa huyết thanh đang được mong đợi, và trong quy trình hoàn toàn không chứa huyết thanh tối ưu này, các tác giả này có thể thu được hàm lượng là $6,3 \times 10^8$ TCID₅₀/ml.

Kreeftenberg et al (2006), đề cập đến việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt để sản xuất vaccin ở quy mô công nghiệp, cũng đề cập đến hiệu suất của nhiều typ nguyên thủy khác nhau và các chủng Sabin của virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào Vero tăng trưởng trên các vi chất mang, mà hiệu suất thu được là giống nhau với các chủng khác nhau, log hàm lượng là từ 8,1 đến 8,6. Các tác giả này cũng mô tả rằng lượng virus cần để sản xuất vaccin cuối cùng cho IPV là cao hơn đáng kể so với cho OPV, mà dẫn đến chi phí sản xuất cho một liều cho IPV cao hơn đáng kể so với một liều cho OPV.

Việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt không chứa huyết thanh bằng cách sử dụng các tế bào Vero được nuôi cấy trên các vi chất mang cũng đã được mô tả bởi (Card et

al, 2005), và mặc dù, mức năng suất thấp hơn trong nuôi cấy tĩnh, thì việc nuôi cấy trên vi chất mang được mô tả là dễ dàng hơn ở quy mô lớn.

Mặc dù, có hiệu quả và khả năng áp dụng công nghiệp của việc nuôi cấy tế bào Vero trên các vi chất mang này, nhưng việc sản xuất số lượng lớn virus gây bệnh bại liệt vẫn tốn tiền và vì thế vẫn có nhu cầu về các hệ thống sản xuất virus gây bệnh bại liệt khác mà ít có sự bất lợi này.

Việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt bằng cách sử dụng các tế bào Vero huyền phù đã được mô tả, dẫn đến hàm lượng virus ($^{10}\log$ CCID₅₀/ml từ 6,5 đến 7,9) thấp hơn so với hàm lượng được quan sát thấy trên các tế bào Vero vi chất mang thông thường (van Eikenhorst et al, 2009).

Mục đích của sáng chế là cung cấp quy trình thích hợp mà có thể được sử dụng để sản xuất các virus gây bệnh bại liệt ở quy mô lớn và kinh tế để sử dụng làm vaccin. Điều này có thể trợ giúp cho các nước đang phát triển tiếp cận được đến việc cung cấp vaccin bại liệt có thể là tốn kém trên cơ sở bền vững.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa vào sự thể hiện của việc nhân lên rất hiệu quả của virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào PER.C6, trong đó theo các phương pháp được mô tả ở đây thu được hàm lượng cao chưa từng có của virus gây bệnh bại liệt. Việc thu được hàm lượng cao như vậy, mà mang lại sự thuận lợi đáng kể về mặt kinh tế trên việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào Vero, không thể được dự đoán trước dựa vào sự sao chép của các virus khác trên các tế bào như vậy, và cũng không dự đoán trước được các điều kiện cho quy trình có khả năng thực hiện được ở quy mô công nghiệp, khi các điều kiện và lợi ích thu được có thể rất rộng cho nhiều typ virus khác nhau mà có các đặc tính khác nhau rất nhiều.

Do đó, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất virus gây bệnh bại liệt, bao gồm các bước sau: a) tạo ra huyền phù nuôi cấy của các tế bào không chứa huyết thanh, mà là các tế bào PER.C6 được nộp lưu với số hiệu ECACC 96022940, b) gây nhiễm virus gây bệnh bại liệt vào các tế bào này, ở mật độ tế bào từ 2×10^6 tế bào/ml đến 150×10^6 tế

bào/ml, và c) thu hoạch virus gây bệnh bại liệt ở thời điểm từ 12 đến 48 giờ sau khi gây nhiễm.

Theo các phương án xác định, việc gây nhiễm này được thực hiện ở mật độ tế bào từ khoảng 5×10^6 tế bào/ml đến 20×10^6 tế bào/ml, ví dụ từ khoảng 8×10^6 tế bào/ml đến 15×10^6 tế bào/ml, ví dụ ở khoảng 10×10^6 tế bào/ml.

Theo các phương án xác định, việc thu hoạch virus gây bệnh bại liệt được thực hiện ở thời gian từ khoảng 18 đến 30 giờ sau khi gây nhiễm, ví dụ ở khoảng 24 giờ sau khi nhiễm virus.

Các điều kiện này cho phép thu được hàm lượng rất cao (gần 10^{10} /ml, mà cao hơn đáng kể gấp 10 lần so với các hàm lượng thu được thông thường bằng cách sử dụng các tế bào Vero trên vi chất mang của các chủng bại liệt kiểu nguyên thủy) của virus gây bệnh bại liệt trong quy trình tương đối ngắn, vì thế nó có các lợi ích đáng kể về kinh tế so với các quy trình được sử dụng hiện nay để sản xuất virus gây bệnh bại liệt để bào chế vaccine. Điều này đã được biểu hiện cho cả ba typ virus gây bệnh bại liệt: typ 1 (chủng Brunenders), typ 2 (chủng MEF) và typ 3 (chủng Saukett).

Do đó, theo các phương án xác định, virus gây bệnh bại liệt là virus gây bệnh bại liệt độc kiểu nguyên thủy ví dụ virus gây bệnh bại liệt typ 1, virus gây bệnh bại liệt typ 2 hoặc virus gây bệnh bại liệt typ 3. Theo các phương án xác định, virus gây bệnh bại liệt là virus gây bệnh bại liệt typ 1 chủng Mahoney hoặc Brunenders, virus gây bệnh bại liệt typ 2 chủng MEF (hoặc MEF-1), hoặc virus gây bệnh bại liệt typ 3 chủng Saukett. Theo các phương án khác, virus gây bệnh bại liệt là virus gây bệnh bại liệt được giảm độc lực tính (trở thành ít độc với thần kinh), ví dụ chủng Sabin (mà có thể là virus typ 1, 2 hoặc 3).

Sáng chế còn đề xuất quy trình sản xuất vaccine bại liệt, bao gồm quy trình sản xuất virus gây bệnh bại liệt theo sáng chế, còn bao gồm cả việc tinh chế, bất hoạt tùy ý, và bào chế virus gây bệnh bại liệt được thu hoạch được để thu được vaccine bại liệt. Đối với IPV, sự bất hoạt được thực hiện bằng formalin hoặc các phương pháp khác. Đối với OPV, sự bất hoạt không được yêu cầu.

Sáng chế cũng đề xuất khối lượng lớn virus gây bệnh bại liệt hữu ích để bào chế vaccin bại liệt, trong đó khối lượng lớn virus gây bệnh bại liệt có thể thu được bằng quy trình sản xuất virus gây bệnh bại liệt theo sáng chế và bao gồm cả môi trường nuôi cấy và hàm lượng virus gây bệnh bại liệt mà ít nhất là $10^{9,4}$ CCID₅₀/ml, ví dụ từ khoảng $10^{9,5}$ đến 10^{11} CCID₅₀/ml, ví dụ từ khoảng $10^{9,8}$ đến $10^{10,8}$ CCID₅₀/ml. Theo các phương án xác định, khối lượng lớn này có thể tích từ 1 đến 1000 lít. Theo các phương án khác, khối lượng lớn này chứa các tế bào và/hoặc các mảnh vụn tế bào, của tế bào được sử dụng theo các quy trình của sáng chế. Theo các phương án xác định, khối lượng lớn này có trong thùng phản ứng sinh học. Theo các phương án khác, khối lượng lớn này bị loại bỏ khỏi thùng phản ứng sinh học và có trong thùng chứa thích hợp.

Sáng chế này cũng đề xuất virus gây bệnh bại liệt và vaccin bại liệt có thể thu được theo các phương pháp của sáng chế. Virus gây bệnh bại liệt và/hoặc vaccin này không có các protein khi, tốt hơn là không có các protein không phải người. Nó cũng không có các phần tế bào chủ không phải là tế bào người khác. Ngược lại, virus gây bệnh bại liệt mà được sản xuất theo các phương pháp thông thường sẽ chứa protein không phải người dư và/hoặc các phần bã không phải của người khác, từ các tế bào chủ được sử dụng và/hoặc từ huyết thanh được sử dụng trong thời gian nuôi cấy tế bào. Do đó, virus gây bệnh bại liệt được sản xuất theo sáng chế này ít bị nhiễm tạp chất không phải của người do quy trình sản xuất hơn so với virus gây bệnh bại liệt được sản xuất bằng các quy trình thông thường.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình để thu được chế phẩm virus gây bệnh bại liệt trên việc nuôi cấy tế bào ở hàm lượng ít nhất là khoảng $10^{9,4}$, tốt hơn là ít nhất $10^{9,8}$, tốt hơn nữa là ít nhất 10^{10} , ví dụ từ $10^{10,5}$ và 10^{11} CCID₅₀/ml, bao gồm các bước sau: a) tạo ra huyền phù các tế bào nuôi cấy không chứa huyết thanh, mà là các tế bào PER.C6, b) gây nhiễm virus gây bệnh bại liệt vào tế bào này, ở mật độ tế bào từ 2×10^6 tế bào/ml đến 150×10^6 tế bào/ml, và c) thu hoạch virus gây bệnh bại liệt ở thời điểm từ 12 đến 48 giờ sau khi gây nhiễm virus để thu được chế phẩm virus gây bệnh bại liệt có mật độ này. Các phương án ưu tiên là giống như được mô tả ở trên cho quy trình sản xuất virus gây bệnh bại liệt theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1. Sản xuất virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào PER.C6 kết dính và Vero.

FIG. 2. Sản xuất virus gây bệnh bại liệt typ 1 trong huyền phù các tế bào PER.C6 trong các môi trường không chứa huyết thanh khác nhau, ở các MOI khác nhau và ở các mật độ tế bào lúc nhiễm virus khác nhau.

FIG. 3. Tác dụng của nhiệt độ và thời gian thu hoạch trên việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt của các typ 1, 2 và 3 trong huyền phù các tế bào PER.C6 trong môi trường không chứa huyết thanh.

FIG. 4. Tác dụng của mật độ tế bào ở lúc nhiễm virus, nhiệt độ, và thời gian thu hoạch trên việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt typ1 trong huyền phù các tế bào PER.C6 trong môi trường không chứa huyết thanh.

FIG. 5. Hiệu quả sản xuất của virus gây bệnh bại liệt typ 1, 2 và 3 trong huyền phù các tế bào PER.C6 không chứa huyết thanh ở mật độ tế bào cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tế bào được sử dụng trong các quy trình của sáng chế là các tế bào PER.C6, mà là tế bào bất tử, cũng đã được biết trong lĩnh vực như là các dòng tế bào liên tục, và có khả năng có khoảng thời gian sống vô hạn (ví dụ xem tài liệu Barrett et al, 2009). Các tế bào PER.C6 dành cho mục đích của sáng chế này sẽ là các tế bào dưới số hiệu ECACC 96022940 được nộp lưu vào ngày 29 tháng 2 năm 1996. Điều sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình là định nghĩa này sẽ bao gồm tế bào từ dòng xuôi hoặc ngược hoặc sự giảm đi của dòng xuôi hoặc ngược của các tế bào được nộp lưu này. Các tế bào PER.C6 được mô tả trong patent Mỹ số 5,994,128 và trong (Fallaux et al, 1998). Các tế bào này rất thích hợp để sản xuất virus cúm để sản xuất vaccin cúm trên tế bào, khi chúng bị nhiễm và nhân lên virus với hiệu quả cao, ví dụ như được mô tả trong (Pau et al, 2001) và WO 01/38362. Các tế bào PER.C6 có khả năng tăng trưởng trong huyền phù không chứa huyết thanh, ví dụ như được mô tả trong (Yallop et al, 2005). Được mô tả ở đây là các tế bào cũng rất thích hợp để sản xuất virus gây bệnh bại liệt có hàm lượng cao trong huyền phù nuôi cấy không chứa huyết thanh.

Hơn nữa, các điều kiện được sử dụng có lợi về kinh tế và điều tiết.

Việc sử dụng các vi chất mang không được yêu cầu đối với sáng chế này, trái ngược với các quy trình được sử dụng rộng rãi với tế bào Vero. Các vi chất mang làm cho việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt có chi phí cao khi sử dụng các quy trình trên tế bào Vero thông thường.

Không chứa huyết thanh theo sáng chế này nghĩa là môi trường được sử dụng cho sự tăng trưởng và sự gây nhiễm vào tế bào thiếu thành phần huyết thanh nguyên vẹn. Điều này có thể là không hoàn toàn không có các sản phẩm có nguồn gốc từ huyết thanh như là ví dụ albumin huyết thanh bò (BSA), tuy nhiên theo các phương án ưu tiên, thì các thành phần như vậy cũng không có mặt, hoặc được sản xuất bằng cách tái tổ hợp khi không có các thành phần có nguồn gốc từ động vật bất kỳ. Theo các phương án ưu tiên, phương pháp hoàn thiện được thực hiện không có thành phần bất kỳ mà có nguồn gốc trực tiếp từ động vật, như là huyết thanh hoặc các thành phần trong huyết thanh, v.v.. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp sản xuất vắc xin được thực hiện trong các điều kiện không có thành phần động vật. Điều này có nghĩa là môi trường được sử dụng cho sự tăng trưởng và nhiễm trùng vào tế bào không có các thành phần có nguồn gốc từ động vật bất kỳ. Hơn nữa, các chất phụ bất kỳ được bổ sung vào môi trường trong suốt quy trình sản xuất vắc xin cũng không có các thành phần có nguồn gốc từ động vật. Việc không có thành phần động vật trong quy trình tạo ra vắc xin bại liệt này cung cấp quy trình được kiểm soát và an toàn hơn. Vì lý do này, các tế bào PER.C6, mà được đặc trưng đầy đủ cho tế bào người và đã được phát triển tuân theo GLP/GMP là rất phù hợp cho việc sử dụng trong việc sản xuất vắc xin. Môi trường nuôi cấy khác nhau có thể được sử dụng, và việc chọn môi trường nuôi cấy tối ưu cho tế bào và các trường hợp được sử dụng là một phần của công việc hàng ngày của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích của sáng chế này do đó đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và nhìn chung có thể thu được từ các nguồn bán sẵn trên thị trường với số lượng lớn, hoặc được tạo ra theo ý khách hàng theo các quy trình thực hiện chuẩn. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện ví dụ trên đĩa, chai quay hoặc trong thùng phản ứng sinh học, bằng cách sử dụng hệ lô, cung cấp theo lô, hệ cung cấp liên tục và tương tự. Để đạt được việc sản xuất virus ở quy mô lớn (liên tục) thông qua dịch nuôi

cấy tế bào, được ưu tiên trong lĩnh vực để có được các tế bào có khả năng phát triển trong huyền phù, và được ưu tiên để có tế bào có khả năng được nuôi cấy khi không chứa huyết thanh có nguồn gốc từ động vật hoặc người hoặc các thành phần của huyết thanh có nguồn gốc động vật hoặc người. Các điều kiện thích hợp để nuôi cấy tế bào đã được biết (ví dụ xem tài liệu Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), và R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, tập bốn (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9). Môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh mà có thể được sử dụng theo các quy trình của sáng chế bao gồm nhưng không bị giới hạn ở môi trường chuẩn mà có thể được đặt từ danh mục các hãng cung cấp môi trường, bao gồm CDM4PERMAb™ (Thermo Scientific HyClone, các số trong danh mục SH30871, SH30872). Hơn nữa, môi trường được cung cấp theo yêu cầu của khách hàng như là Permexcis (Lonza) là thích hợp. Các ví dụ về môi trường không chứa huyết thanh khác mà có thể thích hợp để sử dụng trong các quy trình của sáng chế là AEM (Invitrogen, số danh mục 12582-011), môi trường EX-CELL™ VPRO (JRH Biosciences, số danh mục 14561) và CDM4Retino™ (HyClone, số danh mục SH30520, SH30519).

Theo các phương án tùy chọn và không giới hạn nhất định, thì có thể bổ sung các môi trường không chứa huyết thanh với lipid và/hoặc sản phẩm thủy phân và/hoặc các chất bổ sung khác vào các quy trình của sáng chế để cải thiện thêm năng suất.

Thuật ngữ 'khoảng' hoặc 'gần' của các giá trị bằng số như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là giá trị $\pm 10\%$.

Việc gây nhiễm tế bào với virus gây bệnh bại liệt và/hoặc sự nhân lên virus trong các quy trình của sáng chế này được thực hiện thích hợp ví dụ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 33°C đến 38°C. Theo các phương án ưu tiên, việc gây nhiễm và/hoặc sự nhân lên virus này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 34°C đến 36°C, theo các phương án xác định nhiệt độ là từ khoảng 34,5°C đến 35,5°C, ví dụ ở khoảng 35°C.

Việc gây nhiễm tế bào với virus gây bệnh bại liệt trong các quy trình của sáng chế này có thể được thực hiện thích hợp ví dụ ở độ bội nhiễm (multiplicity of infection - MOI) từ 0,001 đến 10. Theo các phương án xác định, việc gây nhiễm này được thực

hiện ở MOI từ khoảng 1 đến 3, ví dụ ở MOI khoảng 2. Việc gây nhiễm ở MOI tương đối cao như vậy ($> 0,1$, tốt hơn là khoảng 1 hoặc cao hơn) có thể làm cho quy trình có hiệu quả cao, sản lượng cao.

Theo sáng chế này, các tế bào bị nhiễm virus gây bệnh bại liệt, tốt hơn là ở mật độ tế bào cao. Theo các khía cạnh xác định, việc nhiễm virus gây bệnh bại liệt thực hiện khi tế bào có mật độ từ 1×10^6 tế bào/ml đến 150×10^6 tế bào/ml, tốt hơn là từ 2×10^6 tế bào/ml đến 150×10^6 tế bào/ml. Theo các phương án ưu tiên nhất định, việc gây nhiễm này được thực hiện ở mật độ tế bào từ khoảng 5×10^6 tế bào/ml đến 20×10^6 tế bào/ml, ví dụ từ khoảng 8×10^6 tế bào/ml đến 15×10^6 tế bào/ml, ví dụ ở khoảng 10×10^6 tế bào/ml. Như chúng tôi nhận thấy, các quy trình của sáng chế tạo ra các mật độ tế bào cao nhất ở các vacxin không phải từ adenovirus được sản xuất. Ưu điểm của các quy trình của sáng chế là có thể thu được hàm lượng virus gây bệnh bại liệt rất cao, nghĩa là ít nhất cao hơn một cấp khuếch đại so với quy trình Vero thông thường trong lĩnh vực.

Trong các quy trình của sáng chế, virus gây bệnh bại liệt được thu hoạch ở khoảng thời gian từ 12 đến 48 giờ sau khi gây nhiễm. Theo các phương án xác định, việc thu hoạch virus gây bệnh bại liệt được thực hiện ở thời gian từ khoảng 18 đến 30 giờ sau khi gây nhiễm, ví dụ từ khoảng 20 đến 28 giờ, từ khoảng 22 đến 26 giờ sau khi gây nhiễm, ví dụ ở khoảng 24 giờ sau khi gây nhiễm. Do đó, các quy trình của sáng chế có thể được sử dụng để thu được virus gây bệnh bại liệt với hàm lượng cao cực nhanh, mà cũng giúp tạo ra các quy trình cực kỳ hấp dẫn về mặt kinh tế so với các quy trình dài hơn nhiều mà là các quy trình thông thường trong lĩnh vực.

Việc nuôi cấy huyền phù ở quy mô lớn nhất được hoạt động như các quy trình lô hoặc được cung cấp theo lô bởi vì chúng là các quy trình đơn giản nhất để thực hiện và thiết kế, và các quy trình này nói chung là thích hợp làm các quy trình của sáng chế này. Tuy nhiên, các quy trình liên tiếp dựa trên các nguyên tắc vảy rắc đang trở nên phổ biến hơn. Theo các phương án xác định của sáng chế này, tế bào sản xuất được nuôi cấy trong hệ vảy rắc.

Các quy trình theo lô, cung cấp theo lô, vảy rắc và sản xuất vảy rắc sử dụng các tế bào PER.C6, ví dụ để sản xuất kháng thể tái tổ hợp. Trong việc nuôi cấy theo lô,

mật độ tế bào sống thông thường đạt được lớn hơn 12×10^6 tế bào/ml. Mật độ tế bào sống lên đến 40×10^6 tế bào/ml đã biểu thị là tăng gấp nhiều lần so với việc sử dụng theo cung cấp theo lô. Trong các quy trình vảy rắc, các mật độ tế bào đỉnh thông thường đạt được trên 150×10^6 tế bào/ml (Kral et al, 2009).

Việc nuôi cấy vảy rắc tế bào có nghĩa như thông thường được hiểu trong lĩnh vực, nghĩa là trong suốt thời gian nuôi cấy, các tế bào được giữ lại bởi thiết bị tách trong đó có dòng dịch chảy ra có mật độ tế bào thấp hơn trước khi tách và trong đó có dòng môi trường nuôi cấy tế bào chảy vào. Việc sử dụng kiểu nuôi cấy vảy rắc đáp lại sự thách thức về việc các tế bào tăng trưởng ở mật độ cao (ví dụ $10\text{-}50 \times 10^6$ tế bào sống/ml). Để làm tăng mật độ, môi trường được thay thế liên tục, hoặc không liên tục, với dòng cung cấp mới để tạo ra sự thiếu dinh dưỡng cho tế bào và loại bỏ các sản phẩm độc. Sự vảy rắc cũng cho phép kiểm soát tốt hơn môi trường nuôi cấy (pH, dO_2 , mức dinh dưỡng, v.v.). Sự vảy rắc môi trường mới trong việc nuôi cấy có thể đạt được bằng việc giữ lại các tế bào bằng các thiết bị tách khác nhau (ví dụ màng lọc quay cỡ mịn, sợi rỗng hoặc màng lọc màng đĩa phẳng, các ống lắng). Theo các phương án xác định, thiết bị tách là modul màng lọc gồm các sợi rỗng, nghĩa là các màng hình ống. Đường kính bên trong ống thường là từ 0,3 đến 6,0 mm, ví dụ từ 0,5 đến 2,0 mm. Theo các phương án xác định, cỡ mắt lưới (cỡ lỗ) của màng được chọn sao cho cỡ của các lỗ trong mắt lưới gần với đường kính của tế bào, đảm bảo chặn được tế bào ở mức cao trong khi các mảnh vụn tế bào có thể đi qua màng lọc. Theo các phương án khác, cỡ mắt lưới nhỏ hơn đáng kể so với đường kính của tế bào. Tốt hơn là, cỡ mắt lưới là từ 0,1-30 μm , ví dụ từ 0,1 đến 3 μm , ví dụ khoảng 0,2 μm . Các modul lọc gồm các sợi rỗng có bán sẵn trên thị trường ví dụ từ General Electric (trước đây là Amersham).

Sự vảy rắc được sử dụng để duy trì các mức chất chuyển hóa xác định mong muốn và để loại bỏ và do đó làm giảm tạp chất trong môi trường nuôi cấy. Thông thường là sự vảy rắc không được thực hiện ở toàn bộ thời gian trong khi nuôi cấy và nhìn chung chỉ được thực hiện thỉnh thoảng đôi khi trong thời gian sau khi các thành phần môi trường xác định như là glucoza bắt đầu bị dùng hết và cần được thay thế.

Nhiều vảy hệ rắc đã được biết trong lĩnh vực và về cơ bản thích hợp để sử dụng trong các quy trình của sáng chế này. Thuật ngữ "hệ vảy rắc" nghĩa là hệ kết nối của thùng phản ứng sinh học với thiết bị tách. Thiết bị tách có thể được đưa vào thùng

phản ứng sinh học (ví dụ màng lọc quay cỡ mịn) hoặc giữ bên ngoài thùng phản ứng sinh học (ví dụ sợi rỗng). Trong cả hai trường hợp, như được giải thích ở trên, thiết bị tách ngăn cản việc rửa sạch khối tế bào khỏi bình phản ứng và cho phép làm mới môi trường. Theo các phương án xác định, các thùng phản ứng sinh học được hoạt động với (được kết nối với) hệ vảy rắc dòng tiếp tuyến xen kẽ (alternating tangential flow - ATF) (ví dụ hệ ATF, Refine Technology, Co., East Hanover, NJ). Dòng tiếp tuyến có thể thu được theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và như đã được mô tả ví dụ, trong US 6,544,424. Hoạt động của hệ vảy rắc ATF đã được mô tả, và có khả năng thay đổi (Furey, 2002). Các hệ ATF cho phép tế bào được nuôi cấy trong khoảng thời gian dài hơn và đạt được mật độ tế bào cao mà không cần có màng lọc chặn. Thực vậy, các mật độ tế bào cực kỳ cao trên 100×10^6 tế bào sống/ml có thể thu được khi sử dụng hệ vảy rắc ATF, ví dụ với các tế bào PER.C6 (ví dụ xem tài liệu Yallop et al, 2005 và WO 2005/095578). Tuy nhiên, trong các báo cáo trước đây, các tế bào PER.C6 trong các hệ vảy rắc được sử dụng để sản xuất kháng thể tái tổ hợp, nghĩa là một mục đích hoàn toàn khác, và không bị nhiễm virus gây bệnh bại liệt.

Theo các phương án xác định, sự vảy rắc ví dụ là hệ ATF là có lợi trong pha trước khi nuôi cấy (nghĩa là trước khi nhiễm virus gây bệnh bại liệt), khi nó cho phép thu được các mật độ tế bào rất cao, và các tế bào ở trong điều kiện tốt để sau đó nhiễm virus gây bệnh bại liệt. Để đạt đến các mật độ tế bào cao này, thì môi trường nuôi cấy theo các phương án xác định ít nhất là được rắc một phần trong khoảng thời gian trong khi tế bào tăng trưởng. Theo các phương án xác định, sự vảy rắc được bắt đầu mỗi khi mật độ tế bào đạt được từ khoảng 2×10^6 tế bào sống/ml đến 8×10^6 tế bào sống/ml.

Theo các quy trình của sáng chế, các tế bào bị nhiễm virus gây bệnh bại liệt. Thông thường, virus sẽ được tiếp xúc với tế bào sản xuất phù hợp trong các điều kiện tối ưu, cho phép hấp thu virus. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết cách tìm các điều kiện tối ưu khác, nghĩa là tốc độ khuấy, pH, lượng oxy hòa tan (dO_2 hoặc DO). Thường thường, tốc độ khuấy tối ưu là từ khoảng 50 đến 300 vòng/phút, thông thường khoảng 100-200, ví dụ khoảng 150, thông thường DO là 5-60%, pH tối ưu là từ 6,7 đến 7,7. Thông thường, virus gây bệnh bại liệt tự động nhiễm vào tế bào của sáng chế, và mang tế bào cho tiếp xúc với các hạt virus gây bệnh bại liệt là đủ để

nhễm trùng tế bào. Nói chung, kho dự trữ hạt virus gây bệnh bại liệt được thêm vào việc nuôi cấy khi bắt đầu gây nhiễm virus, và sau đó virus gây bệnh bại liệt sẽ nhân lên trong tế bào.

Thuận lợi là có thể gây nhiễm virus gây bệnh bại liệt vào việc nuôi cấy tế bào theo sáng chế ở các mật độ tế bào cao, nghĩa là gần 10×10^6 tế bào/ml, và thu được các hàm lượng virus gây bệnh bại liệt rất cao (cao hơn 10^{10} CCID₅₀/ml).

Theo các phương án xác định, khả năng sống của dịch nuôi cấy tế bào trước khi gây nhiễm vẫn giữ cao hơn 75%, nghĩa là ít nhất 75% tổng lượng tế bào trong dịch nuôi cấy có thể sống được ở thời điểm gây nhiễm. Theo các phương án xác định, khả năng sống của dịch nuôi cấy tế bào lúc gây nhiễm ít nhất là 80%, theo các phương án khác ít nhất là 85%. Khả năng sống có thể đo được bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường có sẵn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, ví dụ phép loại trừ xanh trypan, đếm tế bào Casy, và tương tự.

Theo phương án xác định, mật độ tế bào lúc gây nhiễm là từ khoảng 10×10^6 đến 50×10^6 tế bào sống/ml, ví dụ từ khoảng 10×10^6 đến 20×10^6 tế bào sống/ml, ví dụ từ khoảng 10×10^6 đến 15×10^6 tế bào sống/ml. Các mật độ tế bào này cho phép cho sản lượng virus cao với sự tích tụ mảnh vụn tế bào và ADN tế bào chủ hạn chế, mà đem lại lợi ích của các phương án này trong quy trình thu hoạch virus gây bệnh bại liệt thuận. Do đó, sáng chế này đề cập đến quy trình tối ưu hóa để sản xuất virus gây bệnh bại liệt, thu được hàm lượng virus gây bệnh bại liệt cao, trong khi ở cùng thời điểm tạo ra nguyên liệu thu hoạch mà vẫn có thể quản lý được cho quy trình ngược.

Theo các phương án khác, mật độ tế bào lúc gây nhiễm từ khoảng 15×10^6 đến 150×10^6 tế bào/ml, ví dụ từ khoảng 15×10^6 đến 80×10^6 tế bào/ml, ví dụ từ khoảng 20×10^6 đến 50×10^6 tế bào/ml. Việc gây nhiễm ở các mật độ tế bào này thậm chí có thể tạo ra các mật độ virus cao hơn.

Theo các phương án xác định, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất khối virus gây bệnh bại liệt với hàm lượng ít nhất là 10^{10} CCID₅₀/ml.

Hàm lượng được biểu thị bằng CCID₅₀, mà là 50% liều gây nhiễm dịch nuôi cấy tế bào. Hàm lượng này đôi khi cũng được đề cập đến là TCID₅₀ (50% liều gây

nhiễm dịch nuôi cấy mô), nhưng khi được xác định bằng việc nuôi cấy tế bào, thì ở đây sử dụng thuật ngữ CCID₅₀.

Virut được cho tiếp xúc với tế bào để cho virut gây nhiễm vào tế bào này và nhân lên. Ví dụ, lô hạt virut được thêm vào dịch nuôi cấy tế bào và cho phép hấp thu trên tế bào, ví dụ trong khoảng 30 phút cùng với khuấy nhẹ (ví dụ khoảng 30 vòng/phút), sau đó môi trường nuôi cấy khác có thể được thêm vào và pH được điều chỉnh nếu muốn, tốc độ khuấy có thể điều chỉnh và dịch nuôi cấy được giữ lại. Sau bước gây nhiễm, thực hiện việc khuếch đại một lượng hạt virut. Tất nhiên, bước này tốt hơn là được thực hiện trên các tế bào PER.C6 mà được nuôi cấy trong huyền phù không chứa huyết thanh, và tốt hơn nữa là trong các điều kiện hoàn toàn không có các thành phần có nguồn gốc trực tiếp từ động vật. Bước này có thể được thực hiện thích hợp trong các thùng phản ứng sinh học, ví dụ ở quy mô từ 1 đến 20000 lít, ví dụ từ 10 đến 2000 lít, ví dụ từ 50 đến 1000 lít. mà quy mô có thể dễ dàng được điều chỉnh theo yêu cầu dành cho vacxin. Theo các phương án xác định, thùng phản ứng sinh học là thùng phản ứng sinh học sử dụng đơn lẻ (single use bioreactor - SUB).

Sau khi virut gây bệnh bại liệt nhân lên trong tế bào, virut hoặc các thành phần của nó được thu hoạch từ việc nuôi cấy tế bào. Việc này có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường, mà đã được biết đến đối với chuyên gia. Virut được sản xuất và giải phóng vào môi trường nuôi cấy tế bào có thể được tách khỏi sinh khối tế bào bằng các phương pháp thông thường, như là ly tâm hoặc lọc qua máy siêu lọc, và được thu hoạch trong chất nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy. Trong trường hợp như vậy, sự ly tâm hoặc lọc là bước thu hoạch. Các quy trình thông thường để thu hoạch virut có thể được sử dụng, ví dụ các quy trình được mô tả trong US 4,525,349. Ngắn gọn là, huyền phù môi trường lỏng chứa virut thông thường được rút ra, được lọc và cô đặc bằng ví dụ lọc qua máy siêu lọc. Ví dụ, lúc kết thúc việc nuôi cấy, việc thu hoạch được thực hiện bằng việc thu thập môi trường nuôi cấy chứa huyền phù virut. Dịch thu hoạch có thể được lọc, ví dụ bằng cách sử dụng màng lọc 0,22 μm , và tùy ý được bảo quản ở 4°C.

Dịch thu hoạch được lọc có thể tùy ý được lọc qua máy siêu lọc để cô đặc huyền phù virut, và sau đó, virut gây bệnh bại liệt có thể được tinh chế, ví dụ bằng cách sử dụng lọc gel và/hoặc sắc ký trao đổi ion, ví dụ tiếp sau các quy trình như được

mô tả trong US 4,525,349, hoặc trong (Van Wezel et al, 1978). Huyền phù virus cô đặc thu được có thể tùy ý được pha loãng, và để bào chế IPV mà virus gây bệnh bại liệt ở đó sẽ bị bất hoạt, để có thể sử dụng các phương pháp thông thường.

Các phương pháp thu hoạch và tinh chế virus gây bệnh bại liệt hoặc các thành phần virus, và việc sản xuất các vaccine từ đó đã được sử dụng trong nhiều thập kỷ trong lĩnh vực, và do đó đã được biết đến và được mô tả đầy đủ, ví dụ trong (Van Wezel et al, 1978; Montagnon et al, 1984; WO 2007/007344; US 4,525,349), mà tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các vaccine bại liệt dựa trên các virus sống hoặc các virus bị bất hoạt. Chúng chứa kháng nguyên D virus gây bệnh bại liệt, mà là kháng nguyên bảo vệ quan trọng. Hàm lượng virus thu được có thể được đo bằng các kỹ thuật chuẩn độ virus chuẩn, trong khi việc xác định mật độ kháng nguyên D cũng được thực hiện bằng các kỹ thuật thông thường đã được biết đến với chuyên gia, ví dụ thử nghiệm ELISA kháng nguyên D. Tính gây miễn dịch ví dụ có thể được xác định bằng thử nghiệm in vivo trong các động vật. Hiệu lực có thể được xác định bằng cách sử dụng ELISA kháng nguyên D và bằng thử nghiệm nuôi cấy tế bào trung hòa virus gây bệnh bại liệt trong huyết thanh từ chuột được gây miễn dịch trước đó.

Nói chung, mỗi chủng virus gây bệnh bại liệt được nuôi cấy trong quy trình riêng biệt, và ví dụ nếu vaccine có hóa trị ba chứa ba typ virus gây bệnh bại liệt được bào chế, thì các virus (bất hoạt, đối với IPV) được trộn và được tạo ra để bào chế các liều riêng biệt. Theo các phương án xác định ví dụ, vaccine trong một liều cuối cùng (ví dụ 0,5 ml) ví dụ có thể bao gồm 40 đơn vị kháng nguyên D (D-antigen units - DU) của virus gây bệnh bại liệt typ 1, 8 DU virus gây bệnh bại liệt typ 2 và 32 DU virus gây bệnh bại liệt typ 3, được xác định bằng cách so sánh với chế phẩm đối chiếu.

Việc bất hoạt virus gây bệnh bại liệt có thể được thực hiện theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ bằng formalin hoặc bằng β -propiolacton (BPL) (ví dụ xem tài liệu Jiang et al, 1986). Theo các phương án xác định, việc bất hoạt được thực hiện bằng formalin, ví dụ bằng phương pháp sau: huyền phù virus tinh khiết được lọc qua màng 0,22 μ m, đun nóng đến 37°C cùng với có khuấy từ đều đặn trong 24 giờ, sau đó dung dịch focmon được thêm vào để đạt mật độ 1 trên 4000. Trong khi giữ

huyền phù virus ở 37°C, việc khuấy từ được tiếp tục trong bốn ngày đầu. Vào ngày thứ sáu, huyền phù virus được lọc qua màng 0,22 micron, và việc bất hoạt được tiếp tục trong huyền phù ở 37°C cho đến ngày thứ 12. Huyền phù virus bất hoạt được đồng nhất và có thể được bảo quản, ví dụ ở 4°C. Sau bước này, các lô được cô đặc và/hoặc các lô cuối cùng để dùng được bào chế ví dụ bằng việc trộn các chế phẩm mong muốn.

Theo các phương án xác định, virus gây bệnh bại liệt tinh khiết hoặc thành phần virus được bào chế thành dược phẩm. Việc này có thể được thực hiện theo nhiều phương pháp khác nhau và bằng cách sử dụng nhiều dung dịch đệm theo các phương pháp thông thường đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Nói chung, phải yêu cầu mang các hạt virus gây bệnh bại liệt vào dược phẩm, bao gồm virus gây bệnh bại liệt và ít nhất một tá dược được dụng. Dược phẩm này có thể được bào chế trong các điều kiện đã biết đối với chuyên gia, và theo các phương án xác định thích hợp để dùng cho người. Theo các phương án xác định, dược phẩm có thể chứa môi trường nuôi cấy đệm, mà có thể tùy ý là môi trường Medium M-199, mà được sử dụng như dung dịch đệm dược phẩm cho các vaccine bại liệt bị bất hoạt thông thường đã được đăng ký nhất định. Hơn nữa, nước muối đệm phosphate có thể được sử dụng, và các dược phẩm liều dùng cuối cùng có thể bao gồm ví dụ 0,5% 2-phenoxyetanol và tối đa 0,02% formaldehyd trong một liều làm chất bảo quản chống vi khuẩn.

Các chất mang hoặc tá dược được dụng và các chất pha loãng đã được biết trong lĩnh vực và được sử dụng rộng rãi trong một khoảng rộng các sản phẩm điều trị. Tốt hơn là, chất mang được sử dụng hoạt động tốt trong các vaccine. Theo các phương án xác định, các vaccine còn chứa tá dược, ví dụ phèn. Các tá dược này đã được biết trong lĩnh vực để làm tăng thêm đáp ứng miễn dịch với yếu tố quyết định kháng nguyên được dùng.

Để dùng cho người, sáng chế có thể dùng các dược phẩm chứa virus gây bệnh bại liệt và chất mang hoặc tá dược được dụng. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược dụng" nghĩa là chất mang hoặc tá dược, ở các liều và mật độ được dùng, sẽ không gây ra tác dụng không mong muốn hoặc có hại bất kỳ nào trên các đối tượng dùng chúng. Các chất mang và tá dược được dụng này đã được biết trong lĩnh vực (xem Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., công ty Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides

and Proteins, S. Frokjaer và L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; và Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Các virus gây bệnh bại liệt bị bất hoạt tinh khiết hoặc các phần gây miễn dịch của nó tốt hơn là được bào chế và được dùng như dung dịch vô khuẩn. Các dung dịch vô khuẩn được bào chế bằng lọc vô khuẩn hoặc bằng các phương pháp khác thực chất đã được biết trong lĩnh vực. Các dung dịch sau đó được đông khô hoặc được đổ đầy vào các vật chứa liều dùng dược phẩm. pH của dung dịch nói chung nằm trong khoảng pH từ 3,0 đến 9,5, ví dụ pH từ 5,0 đến 7,5. Virus gây bệnh bại liệt hoặc các phần gây miễn dịch của nó thông thường ở trong dung dịch có dung dịch đệm được dung thích hợp, và dung dịch virus gây bệnh bại liệt có thể cũng chứa muối. Dược phẩm có thể tùy ý có chất làm ổn định, như là albumin. Theo các phương án xác định, chất tẩy được thêm vào. Theo các phương án xác định, vacxin có thể được bào chế thành dạng chế phẩm tiêm được. Các dược phẩm này chứa các lượng hữu hiệu virus gây bệnh bại liệt hoặc các phần gây miễn dịch của nó, là các dung dịch lỏng vô khuẩn, huyền phù lỏng hoặc các dạng đó được đông khô và tùy ý chứa các chất làm ổn định hoặc các tá dược.

Vacxin bại liệt có thể là đơn trị, chứa một typ virus gây bệnh bại liệt (typ 1, 2 hoặc 3), hoặc hóa trị hai (chứa hai typ virus gây bệnh bại liệt, ví dụ các typ 1 và 2, 1 và 3 hoặc 2 và 3), hoặc hóa trị ba (chứa ba typ virus gây bệnh bại liệt, nghĩa là các typ 1, 2 và 3).

Có thể sản xuất IPV từ các virus gây bệnh bại liệt kiểu nguyên thủy. Theo một cách khác, IPV có thể được sản xuất từ virus gây bệnh bại liệt sống không độc hại, ví dụ từ các chủng Sabin, mà sẽ làm giảm nguy cơ virus gây bệnh bại liệt kiểu nguyên thủy lại được đưa vào từ việc sản xuất IPV (ví dụ xem tài liệu WO 2007/007344, và Doi et al, 2001). Sáng chế này thích hợp để sản xuất virus gây bệnh bại liệt kiểu nguyên thủy (các typ 1, 2 và 3, ví dụ typ 1 chủng Mahoney, typ 2 chủng MEF, hoặc typ 3 chủng Saukett) cũng như các typ virus gây bệnh bại liệt không độc hại (ví dụ các chủng Sabin). Sáng chế do đó có thể được sử dụng để sản xuất virus gây bệnh bại liệt cho IPV, cũng như cho OPV. Các quy trình của sáng chế được áp dụng để sản xuất IPV có thể dùng để làm hạ chi phí đến mức mà IPV có thể trở thành có sẵn đối với các nước ít và ít phát triển nhất. Mặc dù, nhìn chung khi được bào chế theo các phương

pháp thông thường thì OPV rẻ hơn IPV, nhưng các quy trình theo sáng chế có hiệu quả cao có thể vẫn làm giảm chi phí của khối nguyên liệu lớn cho OPV và do đó cũng làm giảm chi phí của nó.

Việc dùng vaccin bại liệt ví dụ có thể được thực hiện qua đường trong cơ, trong da, hoặc qua miệng, theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Vaccin bại liệt có thể thu được theo sáng chế có thể được sử dụng như vaccin độc lập, nhưng theo các phương án khác có thể được kết hợp với các vaccin khác theo cách thông thường, ví dụ ở dạng vaccin kết hợp chống lại bệnh bạch hầu, ho gà, uốn ván và bệnh bại liệt, và có thể tùy ý bao gồm các thành phần vaccin khác, ví dụ chống lại bệnh viêm gan B và/hoặc cúm, .v.v.. Do đó, virus gây bệnh bại liệt thích hợp để sử dụng trong chương trình tiêm chủng mở rộng (expanded program on immunization - EPI), và có thể được kết hợp với các vaccin khác trong chương trình đó. Tương tự với các vaccin bại liệt thông thường, vaccin theo sáng chế có thể được dùng ở dạng liều đơn, hoặc tốt hơn là trong các liều tăng cường miễn dịch đầu tiên trong đó nhiều liều vaccin được dùng với khoảng cách thời gian thích hợp, ví dụ hai lần tiêm ở khoảng cách thời gian 1-2 tháng, được tiếp theo với liều tăng cường sau đó 6-12 tháng; hoặc ví dụ khởi đầu liều dùng qua đường miệng, được tiếp tục bằng liều thứ hai sau đó khoảng 8 tuần và liều thứ ba sau liều thứ nhất từ 8-12 tháng; hoặc ví dụ đối với trẻ sơ sinh liều dùng qua đường miệng đầu tiên ở 6-12 tuần tuổi, được tiếp theo bằng liều thứ hai sau liều thứ nhất khoảng 8 tuần và liều thứ ba ở khoảng 6-18 tháng tuổi; hoặc ví dụ chỉ một liều đơn cho người đã được tiêm chủng trước đó ở thời điểm có nguy cơ mắc bệnh cao; .v.v.. Chế độ liều dùng tối ưu có thể được quyết định theo việc thực hành y khoa chuẩn và nói chung sẽ tuân theo sơ đồ tương tự như các sơ đồ sử dụng của các vaccin bại liệt có sẵn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích thêm trong phần ví dụ thực hiện sau đây. Ví dụ thực hiện không làm hạn chế sáng chế theo bất kỳ cách nào. Chúng chỉ đơn thuần dùng để làm rõ sáng chế.

Ví dụ 1: Sản xuất virus gây bệnh bại liệt hiệu quả trên các tế bào PER.C6 kết dính

Để kiểm tra sự nhân lên virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào PER.C6 kết dính và tạo ra các kho dự trữ virus, virus gây bệnh bại liệt typ 1 (Brunenders), typ 2 (MEF-1) và typ 3 (Sauckett), được lấy từ SBL (Sweden). Hàm lượng của các kho dự trữ này, mà chúng đều được sản xuất trên các tế bào Vero, là gần 10^6 CCID₅₀/ml. Các tế bào PER.C6 (Fallaux et al, 1998) được tăng trưởng trong môi trường nuôi cấy (DMEM với FBS 10% và MgCl₂ 10mM). Ba bình thót cổ T175 được rắc 30×10^6 tế bào PER.C6/bình trong 25 ml môi trường nuôi cấy cho mỗi typ virus gây bệnh bại liệt và được tiêm chủng vào ngày tiếp theo với độ bội nhiễm (MOI) 0,1 (0,1 CCID₅₀/tế bào) ở 37°C và 10% CO₂ trong lò ủ ẩm. Ba ngày sau, tế bào và môi trường được thu hoạch và sản phẩm phân giải thô được bào chế bằng hai chu kỳ đông lạnh/tan đông. Sau khi ly tâm để loại bỏ các mảnh vụn tế bào, các chất nổi trên bề mặt được chia thành các phần và được bảo quản ở -80°C. Đồng thời, một bình T175 được rắc $6,25 \times 10^6$ tế bào Vero trong 25 ml môi trường nuôi cấy tế bào Vero (môi trường Optipro SFM được bổ sung 4 mM L-glutamin) cho mỗi chủng virus gây bệnh bại liệt và được gây nhiễm với các MOI giống nhau. Các dịch nuôi cấy tế bào Vero cũng được thu hoạch sau 3 ngày, qua hai lần đông lạnh/tan đông và được chia phần để bảo quản.

Việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt sau đó được định lượng bằng thử nghiệm CCID₅₀ bằng cách sử dụng các tế bào Vero. Theo đó, $1,25 \times 10^4$ tế bào Vero được rắc vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ trong 100 µl môi trường và được ủ ở 37°C và 5% CO₂. Ngày tiếp theo, hàng loạt mẫu virus gây bệnh bại liệt pha loãng 15 lần được bào chế trong môi trường nuôi cấy tế bào Vero và 100 µl dung dịch pha loãng từ số 5 đến 15 được thêm vào cột từ 1 đến 11 trong đĩa 96 lỗ với mật độ pha loãng 8 lần. Cột 12 được dùng như cột đối chứng không bị gây nhiễm. 7 ngày sau, các lỗ được phân tích về việc xảy ra tác dụng gây bệnh trên tế bào (cytopathogenic effect - CPE) và hàm lượng được tính bằng cách sử dụng phương pháp Spearman-Kärber:

Hàm lượng điểm cuối ($\log_{10}$) = $X_0 - d/2 + d/n \cdot \sum X_i$

trong đó X_0 là $\log_{10}$ của giá trị pha loãng cao nhất ở đó tất cả việc tiêm chủng vẫn dương tính, d là $\log_{10}$ của giá trị tác nhân pha loãng được sử dụng, n là số bản sao chép

tế bào ở mỗi mật độ pha loãng và ΣX_i là tổng của tất cả các lỗ dương tính bao gồm cả mật độ pha loãng X_0 .

Kết quả của thử nghiệm chuẩn độ được mô tả trong Fig. 1 và cho thấy rằng trên các tế bào PER.C6 kết dính hàm lượng virus gây bệnh bại liệt typ 1 cao gấp >5 lần so với trên các tế bào Vero và cao gấp >10 lần trong các trường hợp của virus typ 2 và 3. Sự khác biệt trong việc sản xuất các hạt virus trên tế bào được mong đợi là nhỏ hơn khi rắc nhiều tế bào PER.C6 hơn. Đối với cả tế bào PER.C6 và Vero thì sự hợp lưu của lớp đơn tế bào được ước tính là ~80%.

Từ các thử nghiệm này, chúng tôi kết luận rằng việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt trên các lớp đơn kết dính của các tế bào PER.C6 ít nhất cũng tốt như trên các tế bào Vero.

Ví dụ 2: Sản xuất virus gây bệnh bại liệt hiệu quả trên các tế bào PER.C6 trong huyền phù

Để kiểm tra sự nhân lên của virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào PER.C6 trong huyền phù, các thử nghiệm ở quy mô nhỏ được thực hiện để kiểm tra các môi trường nuôi cấy khác nhau, độ bội nhiễm (MOI) và thời gian thu hoạch (TOH). Theo đây, các tế bào PER.C6 được nuôi cấy trong ba môi trường khác nhau: AEM (Invitrogen), BMIVg (có bán sẵn trên thị trường là Permexcis™, từ Lonza) và CDM4PERMAb (Hyclone). Vào ngày gây nhiễm virus, tế bào được nuôi cấy trong một kiểu môi trường được đếm và được rắc trở lại vào kiểu môi trường giống hệt với các mật độ tế bào khác nhau (1,5, 2,5, 3,5 hoặc 5 triệu tế bào/ml) và được gây nhiễm với các MOI khác nhau (0,01, 0,05 hoặc 0,1 CCID₅₀/tế bào) ở 37°C trong lò ủ ẩm đặt trên bề lắc. Bệ (IKA KS 260) có đường kính ổ 10 mm và được sử dụng ở tốc độ 100 vòng/phút trong các bình lắc thót cổ có thể tích 125 hoặc 250 ml được đổ đầy với 15-20 ml môi trường. Đối với môi trường AEM, các tế bào được rắc với mật độ 1,5 hoặc 2,5 triệu tế bào/ml bởi vì AEM không chịu các mật độ tế bào cao hơn. Theo cách này, nhiều dịch nuôi cấy được bảo chế mà được thu hoạch sau khi gây nhiễm từ 2, 3 hoặc 4 ngày. Tất cả các mẫu được đông lạnh/tan đông hai lần và được giữ ở -20°C hoặc nhiệt độ thấp hơn cho đến khi phân tích.

Fig. 2 mô tả các kết quả chuẩn độ của các mẫu này trong các mẫu ở ngày thứ 2 và ngày thứ 4 (dữ liệu ngày thứ 3 không được trình bày). Các tế bào PER.C6 đã tăng trưởng và đã bị nhiễm virus trong cả ba môi trường có khả năng sản xuất hàm lượng virus gây bệnh bại liệt typ 1 cao, mặc dù môi trường BMIVg cung cấp các hàm lượng hơi thấp hơn so với môi trường PERMAb và AEM. Hơn nữa, việc ủ kéo dài hơn không dẫn đến các hàm lượng virus cao hơn. Ngược lại, trong hầu hết các trường hợp việc thu hoạch ở ngày thứ 2 cung cấp hàm lượng cao hơn so với việc thu hoạch ở các ngày thứ 3 và 4. Tác dụng nhất quán của việc biến đổi các MOI có thể không được nhận thấy trong thử nghiệm này. Quan trọng là, việc sử dụng các mật độ tế bào cao hơn vào lúc gây nhiễm dẫn đến các hàm lượng thể tích cao hơn cho thấy rằng quy trình nuôi cấy huyền phù bằng cách sử dụng các mật độ tế bào cao là có lợi cho hiệu suất thu được virus gây bệnh bại liệt nhiễm trùng.

Trong thử nghiệm tiếp theo, thời gian thu hoạch và nhiệt độ trong khi gây nhiễm được so sánh trong cả ba chủng virus gây bệnh bại liệt. Theo đây, các tế bào PER.C6 được rắc vào môi trường AEM với mật độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml trong thể tích 15 ml trong các bình lắc thót cổ và bị gây nhiễm với mỗi chủng virus gây bệnh bại liệt với MOI 0,1 ở 37°C và ở 35°C . Tế bào và môi trường được thu hoạch sau khi gây nhiễm từ 2, 3 và 4 ngày và được xử lý như được mô tả ở trên. Phân tích việc sản xuất virus dưới các điều kiện khác nhau đã được thực hiện bằng việc xác định giá trị CCID_{50} như được mô tả ở trên và đã cho thấy hiệu suất tăng hơn ở 35°C so với ở 37°C cho cả ba typ virus gây bệnh bại liệt (Fig. 3). Ngoài ra, điều này đã được khẳng định và mở rộng cho các virus gây bệnh bại liệt typ 2 và 3 mà trong hầu hết các trường hợp thì hàm lượng virus cao nhất được đo khi thu hoạch ở ngày thứ 2.

Ví dụ 3: Sản lượng virus gây bệnh bại liệt trong huyền phù các tế bào PER.C6 tăng lên với mật độ tế bào cao hơn

Để nghiên cứu rằng liệu mật độ tế bào tăng lên có dẫn đến sự tăng hàm lượng virus không, thì việc sản xuất ở mật độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml được so sánh với ở mật độ 10×10^6 tế bào/ml. Theo đó, các tế bào PER.C6 trong môi trường PERMAb được rắc vào thể tích 15 ml trong các bình lắc thót cổ ở các mật độ tế bào được chỉ ra và được gây nhiễm với mật độ 2 CCID_{50} /tế bào virus gây bệnh bại liệt typ 1 tiến hành ba lần. Sau 24 và 48 giờ thu hoạch các tế bào và môi trường và các sản phẩm phân giải được

làm sạch được bào chế bằng chu kỳ đông lạnh/tan đông và ly tâm như được mô tả ở trên. Ngoài các nhiệt độ được thử nghiệm ở phía trước là 35 và 37°C, thử nghiệm cũng được tiến hành ở 33°C.

Phân tích hàm lượng virus thu được bằng thử nghiệm CCID₅₀ (Fig. 4) đã khẳng định rằng sản lượng được cải thiện khi tế bào được gây nhiễm ở mật độ 10×10^6 tế bào/ml so với ở mật độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Hàm lượng tốt nhất thu được ở 35°C không kể đến mật độ tế bào hoặc ngày thu hoạch. Hơn nữa, và chỉ ra sự nhân lên virus gây bệnh bại liệt hiệu quả trên các tế bào PER.C6, điều đã cho thấy là việc thu hoạch có thể cũng được tiến hành sau 24 giờ do sản lượng trong các mẫu 24 giờ hoặc 48 giờ hoàn toàn so sánh được.

Trong thử nghiệm tiếp theo, các điều kiện này cũng được thử nghiệm cho các typ virus gây bệnh bại liệt khác. Các tế bào PER.C6 được rắc vào môi trường PERMAb ở mật độ 10×10^6 tế bào/ml và được gây nhiễm với mật độ 2 CCID₅₀/tế bào ở 35°C trong các bình lắc thót cổ tiến hành ba lần với các kho dự trữ virus gây bệnh bại liệt khác nhau. Việc thu hoạch được thực hiện sau 24 và 48 giờ và tế bào và môi trường được xử lý thành các sản phẩm phân giải được làm sạch như được mô tả ở trên. Sự chuẩn độ bằng thử nghiệm CCID₅₀ đã cho thấy rằng việc sử dụng các mật độ tế bào cao cũng dẫn đến sản lượng virus typ 2 và 3 thu được (Fig. 5) cao.

Điều này cho thấy rõ ràng là việc nuôi cấy các tế bào PER.C6 ở mật độ cao trong huyền phù mang lại bề tuyệt vời để sản xuất virus gây bệnh bại liệt typ nguyên thủy. Khi mật độ tế bào PER.C6 và kích cỡ/thể tích của dịch nuôi cấy có thể được tăng lên bằng cách sử dụng hệ thống phản ứng sinh học, túi gợn sóng hoặc các kiểu hệ nuôi cấy nâng cấp khác để nuôi cấy, thì việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt có thể được cải thiện đáng kể so với việc nuôi cấy tế bào Vero với hệ vi chất mang hiện nay.

Virus gây bệnh bại liệt được tạo ra được thu hoạch và tinh chế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực và được sử dụng để virus gây bệnh bại liệt nhân lên trên tế bào Vero, bị bất hoạt bằng fomanlin theo các phương pháp đã biết, và sau đó tính gây miễn dịch được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm gây miễn dịch chuẩn trên chuột, theo các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực (ví dụ Bevilacqua et al, 1996). Được mong đợi là virus gây bệnh bại liệt được sản xuất đó có tính gây miễn

dịch có thể so được với virus gây bệnh bại liệt được sản xuất bằng các quy trình thông thường bằng cách sử dụng các tế bào Vero.

Ví dụ 4: Sản xuất virus gây bệnh bại liệt trên các tế bào PER.C6 trong thùng phản ứng sinh học

Tế bào được làm tan từ ngân hàng tế bào PER.C6 hoạt động, và được nhân lên trong môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh trong lò ủ ẩm ở 37°C và 10% CO₂. Việc nuôi cấy cấp hai được thực hiện cứ sau 3 đến 4 ngày cho đến khi đạt được mật độ tế bào 0,2-0,4x10⁶ tế bào/ml để tiêm vào thùng phản ứng sinh học 2L. Tế bào được nhân lên trong thùng phản ứng sinh học 2L ở 37°C, DO 40%, và pH 7,3. Khi mật độ tế bào đạt được xấp xỉ 2x10⁶ tế bào/ml (sau khi tiêm 4 ngày) hệ ATF được bắt đầu, để cho phép tế bào được nuôi cấy trong khoảng thời gian dài hơn và đạt được mật độ tế bào cao. Sau xấp xỉ từ 11 đến 12 ngày, mật độ tế bào trong thùng phản ứng sinh học 2L đạt được cao hơn 50x10⁶ tế bào/ml. Ở thời điểm này, huyền phù tế bào được chuyển vào thùng phản ứng sinh học 10L. Huyền phù tế bào từ thùng phản ứng sinh học 2L được pha loãng ở tỷ lệ 1:5 bằng môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh. Mật độ tế bào trong thùng phản ứng sinh học 10L là từ 10 đến 15x10⁶ tế bào/ml. Sau đó, thùng phản ứng sinh học 10L được gây nhiễm virus bằng kho hạt virus gây bệnh bại liệt với MOI 2 CCID₅₀/tế bào. Việc sản xuất virus gây bệnh bại liệt được thực hiện ở 35°C, pH 7,3 và DO 40%. Thùng phản ứng sinh học 10L được lấy mẫu ở các thời điểm nhất định để đếm tế bào và sản xuất virus gây bệnh bại liệt, và việc thu hoạch virus gây bệnh bại liệt được thực hiện thích hợp từ 12 đến 48 giờ sau khi gây nhiễm virus.

Tài liệu tham khảo

Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. 2009. Vero Cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based virus vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 8: 607-618.

Bevilacqua JM, Young L, Chiu SW, Sparkes JD, Kreeftenberg JG. 1996. Rat immunogenicity assay of inactivated poliovirus. *Dev. Biol. Stand.* 86: 121-127.

Campbell SA, Lin J, Dobrikova EY, Gromeier M. 2005. Genetic determinants of cell type-specific poliovirus propagation in HEK 293 cells. *J. Virol.* 79: 6281-6290.

Card CJ, Smith T, Hunsaker B, Barnett B. 2005. Serum-free production of poliovirus: A comparative study using microcarrier, roller bottles and stationary cell culture. In: F. Gòdia và M. Fussenegger (Eds.), *Animal Cell Technology meets Genomics*, 761-765.

Doi Y, Abe S, Yamamoto H, Horie H, et al. 2001. Progress with inactivated poliovirus vaccine derived from the Sabin strains. In: Brown F (ed): *Progress in Polio Eradication: Vaccine Strategies for the End Game*. Dev. Biol. 105: 163-169.

Van Eikenhorst G, Bakker WAM, Thomassen YE, van der Pol LA. 2009. Platform technology for virus vaccine production: comparison between attached and suspension Vero cells. Áp phích và tóm tắt trang 70. Trong: Chương trình và sách tóm tắt, cuộc họp lần thứ 21 của hiệp hội châu Âu về công nghệ tế bào động vật.

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, et al. New helper cell and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1998 Sep 1;9(13):1909-17.

Furey J. Scale-up of a cell culture perfusion process – A low-shear filtration system that inhibits filter-membrane fouling. *Genetic Engineering News*. Vol. 22, No. 7, April 2002.

Jiang S, Pye D, Cox JC. 1986. Inactivation of poliovirus with β -propiolactone. *J. Biol. Stand.* 14: 103-109.

John J. 2009. Role of injectable and oral oral polio vaccines in polio eradication. *Expert Rev. Vaccines* 8: 5-8.

Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. 2005. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 587-635.

Kral KM, Golden K, Zijlstra G, Swaving J, Nieboer M, Chon JH. 2009. Advances in high yielding platform production processes using the PER.C6® human cell line. Abstract P142. Trong: Chương trình và sách tóm tắt, cuộc họp lần thứ 21 của hiệp hội châu Âu về công nghệ tế bào động vật.

Merten O.-W., Wu R, Couvé E, Crainic R. 1997. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. *Cytotechnology* 25: 35-44.

Montagnon B, Vincent-Falquet JC, Fanget B. 1982. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed poliovirus vaccine. Promising results. *Develop. Biol. Standard.* 55: 37-42.

Montagnon BJ, Fanget B, Vincent-Falquet JC. 1984. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. *Rev. Infect. Dis.* 6 (suppl. 2): S341-S344.

Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccine. *Vaccine* 2001 Mar 21;19(17-19):2716-21.

Van Wezel AL, van Steenis G, Hannik CA, Cohen H. 1978. New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccine. *Develop. biol. Standard.* 41: 159-168.

Wright PF, Modlin JF. 2008. The demise and rebirth of Polio – A modern Phoenix? *J. Infect. Dis.* 197: 335-336.

Yakovenko ML, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP et al. 2009. Evolution of the Sabin vaccine into pathogenic derivatives without appreciable changes in antigenic properties: need for improvement of current poliovirus surveillance. *J. Virol.* 83: 3402-3406.

Yallop C, Crowley J, Cote J, Hegmans-Brouwer K, Lagerwerf F, Gagne R, Martin JC, Oosterhuis N, Opstelten DJ, Bout A. PER.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins. *Modern Biopharmaceuticals – Design, Development and Optimization.* Vol. 3, 2005.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất virus gây bệnh bại liệt, trong đó quy trình bao gồm các bước sau:
 - a) tạo ra huyền phù nuôi cấy của các tế bào không chứa huyết thanh, trong đó các tế bào là các tế bào PER.C6 được nộp lưu với số hiệu ECACC 96022940,
 - b) gây nhiễm virus gây bệnh bại liệt vào tế bào này, với mật độ tế bào từ 2×10^6 tế bào/ml đến 150×10^6 tế bào/ml, và
 - c) thu hoạch virus gây bệnh bại liệt sau khi gây nhiễm từ 12 đến 48 giờ.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước gây nhiễm và/hoặc nhân lên của virus được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 34°C đến 36°C .
3. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước gây nhiễm được thực hiện với mật độ tế bào từ 5×10^6 tế bào/ml đến 20×10^6 tế bào/ml.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước gây nhiễm được thực hiện với mật độ tế bào khoảng 10×10^6 tế bào/ml.
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước gây nhiễm được thực hiện với độ bội nhiễm (multiplicity of infection - MOI) từ 1 đến 3.
6. Quy trình theo điểm 5, trong đó bước gây nhiễm được thực hiện với độ bội nhiễm bằng 2.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước thu hoạch virus gây bệnh bại liệt được thực hiện sau khi gây nhiễm từ 18 đến 30 giờ.
8. Quy trình theo điểm 7, trong đó bước thu hoạch virus gây bệnh bại liệt được thực hiện sau khi gây nhiễm khoảng 24 giờ.
9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó virus gây bệnh bại liệt là virus gây bệnh bại liệt typ 1, virus gây bệnh bại liệt typ 2 hoặc virus gây bệnh bại liệt typ 3.

10. Quy trình theo điểm 9, trong đó virus gây bệnh bại liệt là virus gây bệnh bại liệt typ 1 chủng Mahoney, virus gây bệnh bại liệt typ 2 chủng MEF, hoặc virus gây bệnh bại liệt typ 3 chủng Saukett.
11. Quy trình theo điểm 9, trong đó virus gây bệnh bại liệt là virus gây bệnh bại liệt được giảm độc lực.
12. Quy trình theo điểm 11, trong đó virus gây bệnh bại liệt được giảm độc lực là virus chủng Sabin.
13. Quy trình sản xuất vaccin bại liệt, bao gồm quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, còn bao gồm thêm bước tinh chế, bất hoạt tùy ý, và bào chế virus gây bệnh bại liệt thu hoạch được để thu được vaccin bại liệt.

1/5

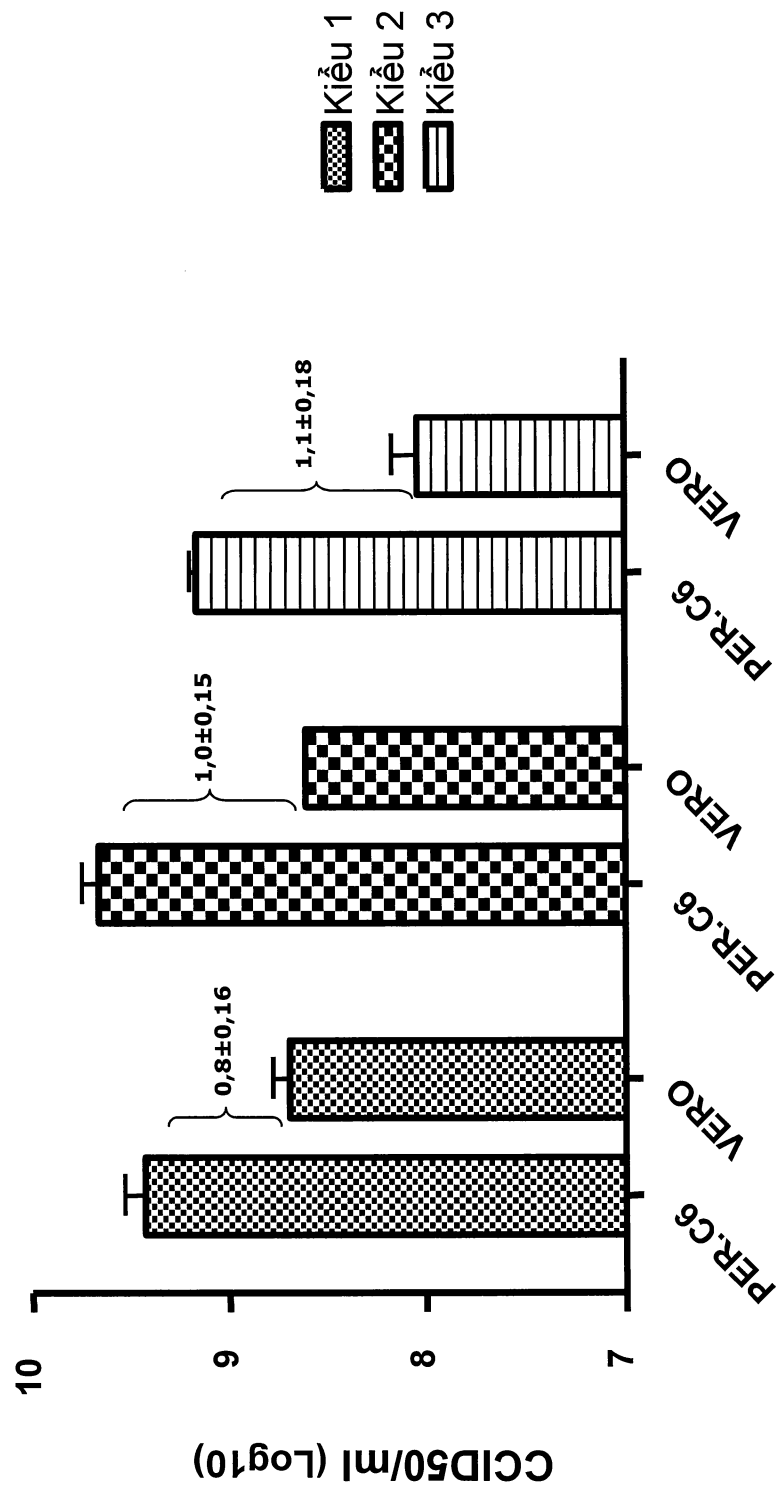
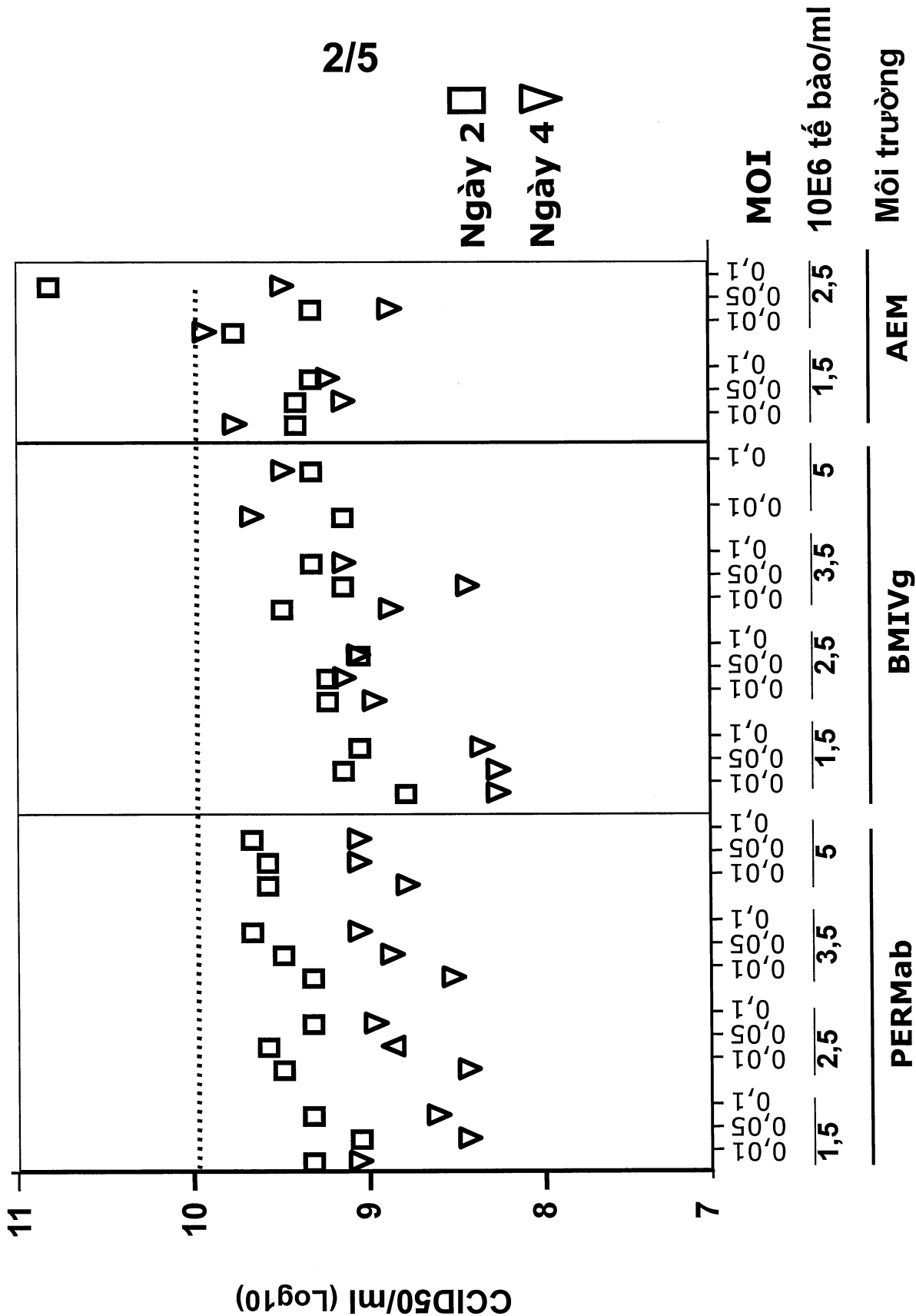


Fig. 1

Fig. 2



3/5

Fig. 3

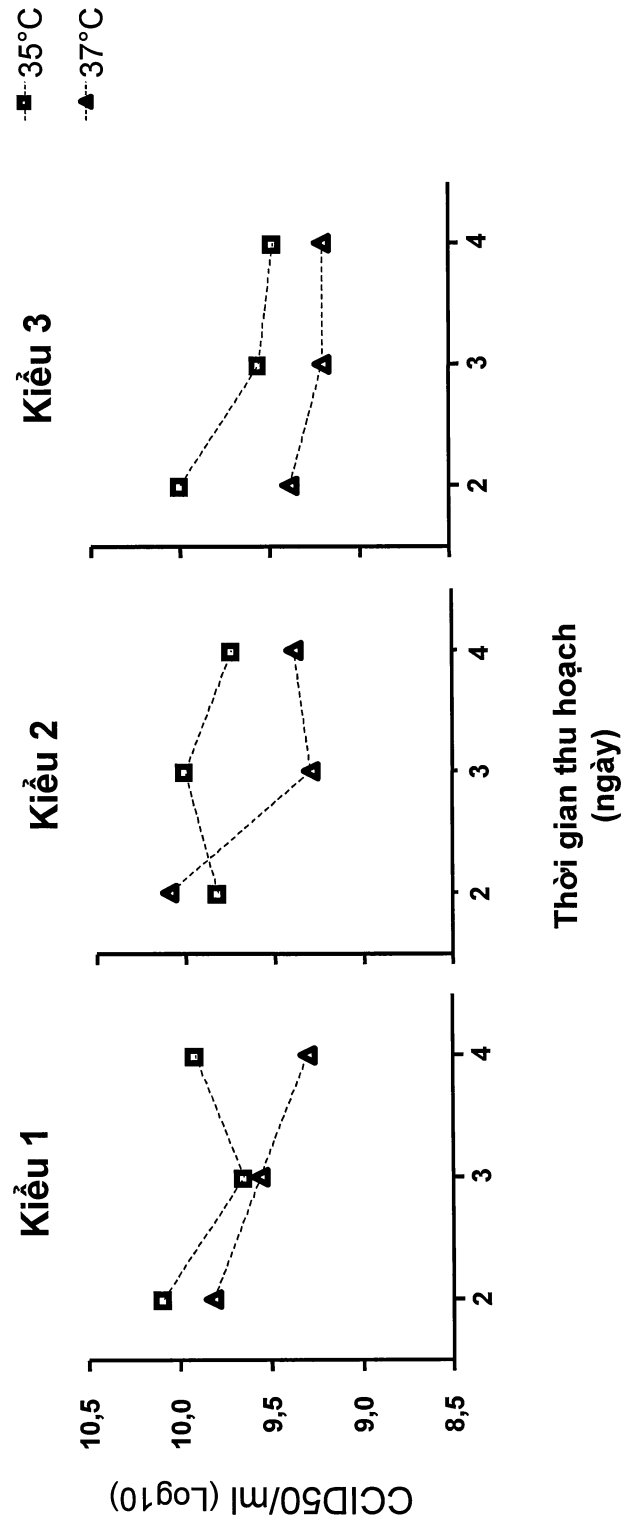
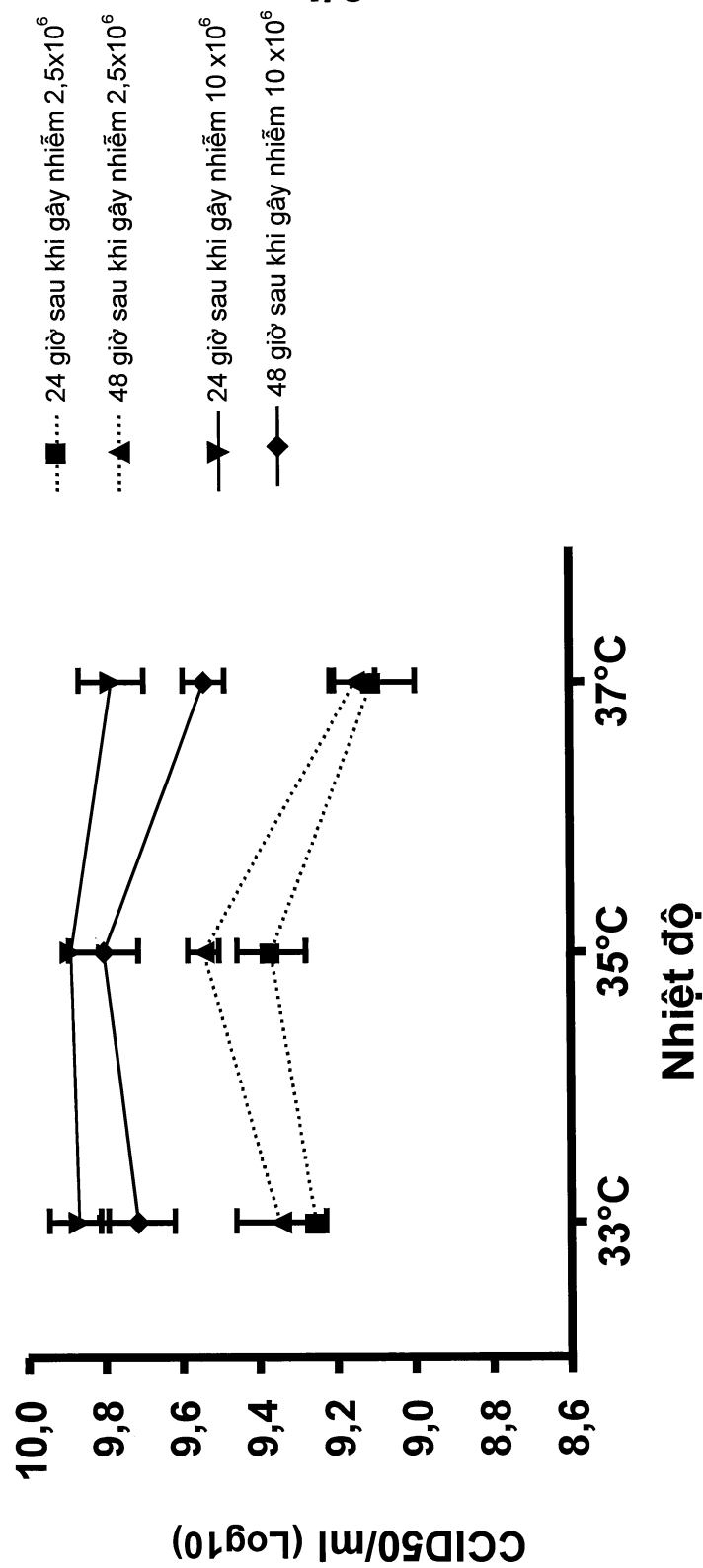
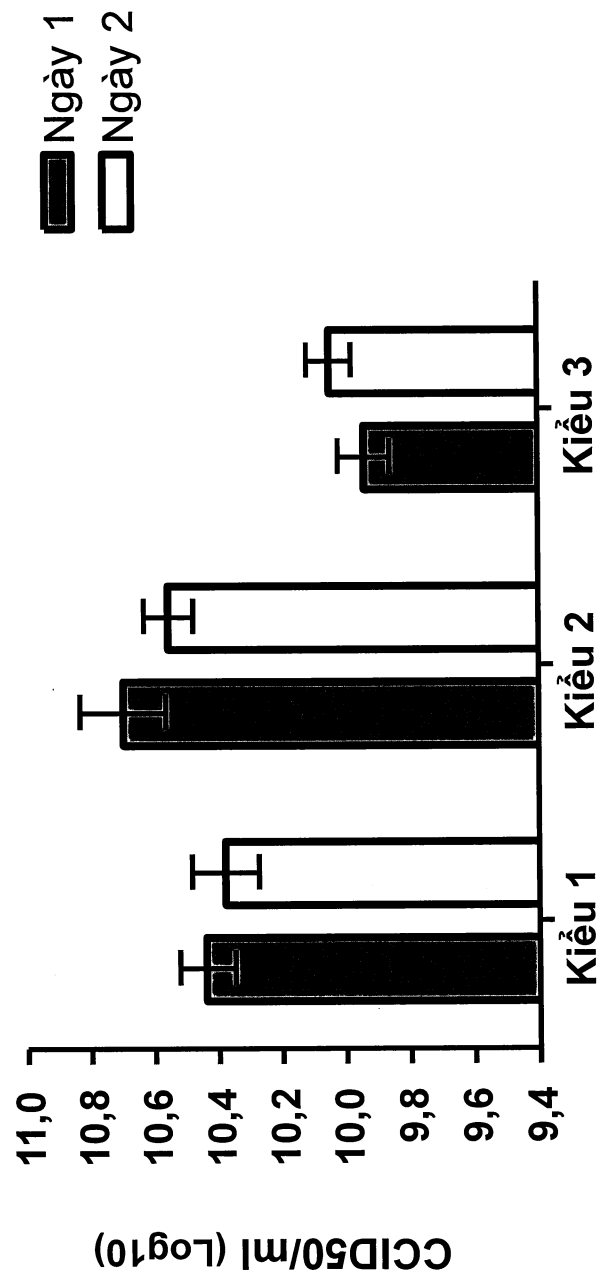


Fig. 4



5/5

Fig. 5



Virus gây bệnh bại liệt